

ESTRESSE OXIDATIVO EM ERITRÓCITOS SUBMETIDOS A 2,2-AZOBIS AMIDINOPROPANO (AAPH): EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTI-HEMOLÍTICO DO CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*)

Wanderlei Onofre Schmitz¹
Andréa Name Colado Simão²
Rubens Cecchini³
Halha Ostrensky Saridakis⁴

SCHMITZ, W. O., SIMÃO, A. N. C., CECCHINI, R., SARIDAKIS, H. O. Estresse oxidativo em eritrócitos: efeito antioxidante e anti-hemolítico do chá verde (*Camellia sinensis*). *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, Umuarama, v. 12, n. 3, p. 175-179, set./dez. 2008.

RESUMO: O chá verde (*Camellia sinensis*) é uma bebida, bastante consumida pelos orientais, cuja composição apresenta as catequinas, polifenóis que possuem atividade antioxidante, quimioprotetora, antiinflamatória e anti-carcinogênica. Vários estudos têm demonstrado que o chá verde pode prevenir várias doenças associadas ao estresse oxidativo, tais como o câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Estes efeitos benéficos dependerão da quantidade de chá consumida e da biodisponibilidade das catequinas. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação do extrato do chá verde (ECV) na inibição da hemólise oxidativa induzida pelo 2,2 azobis amidinopropano (AAPH). Este composto é um gerador de radicais livres que, a 37°C e ao abrigo da luz, gera radicais do tipo peroxil a uma taxa constante. Hemácias humanas de doadores saudáveis foram submetidas à AAPH e ao extrato de chá verde em diferentes concentrações. Os resultados indicam que o chá verde, na concentração de 0,54 mg/ML, é um ótimo antioxidante e anti-hemolítico, inibindo em 81,6% a hemólise oxidativa de hemácias tratadas com AAPH. A ação antioxidante durou até 5 horas após a exposição das hemácias aos radicais livres gerados pelo AAPH, sendo que o chá verde, por si só, não levou a nenhuma lesão as hemácias. Nossos dados demonstram, pela primeira vez, que o chá verde pode inibir a hemólise oxidativa de eritrócitos humanos. Ensaios clínicos são necessários para investigar os possíveis benefícios do uso do chá verde como adjuvante terapêutico em doenças hemolíticas que envolvam a ação de radicais livres.

PALAVRAS-CHAVE: *Camellia sinensis*; Chá verde; Estresse oxidativo; Hemólise.

OXIDATIVE STRESS IN ERYTHROCYTES SUBMITTED TO 2,2-AZOBIS AMIDINOPROPANE (AAPH): ANTIOXIDANT EFFECT AND ANTI-HEMOLYTIC EFFECTS OF GREEN TEA (*Camellia sinensis*)

ABSTRACT: Green tea (*Camellia sinensis*) is one of the most often consumed drinks by the Oriental and its components such as Catechin, Polyphenols have antioxidant, chemoprotective, anti-inflammatory and anti-carcinogenic activities. Several studies have demonstrated that green tea is capable of preventing diseases associated with oxidative stress, such as cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases. These beneficial effects will depend on the quantity of green tea consumed and the bioavailability of the catechins. The aim of this study was to assess the effect of the green tea extract (GTE) on the inhibition of oxidant hemolysis induced by 2,2 azobis amidinopropane (AAPH). This component generates free radicals which, at 37°C and daylight sheltered, may generate the type of radical called peroxil at a fairly constant rate. Red blood cells from healthy donors were submitted to the AAPH and to the green tea extract at different levels of concentration. The results indicated that in a concentration of 0.54 mg/mL works as an excellent antioxidant inhibiting 81.6 % of hemolysis in red blood cells with AAPH. The antioxidant activity lasted for 5 hours after exposing red blood cells to the free-radical generated by AAPH, and it must be said that green tea alone did not cause any lesion to red blood cells. It is the first time that our data shows that green tea may inhibit oxidant hemolysis in human erythrocyte. Clinical trials are necessary in order to find out the possible benefits of the use of green tea as a therapeutical adjuvant for hemolytic diseases involving the action of the free-radicals.

KEYWORDS: *Camellia sinensis*; Green tea; Oxidative stress; Hemolysis.

Introdução

O chá verde é uma bebida bastante consumida pelos orientais e é obtido por infusão das folhas da planta *Camellia sinensis*. Este chá é muito rico em polifenóis chamados de catequinas, os quais são os principais componentes terapêuticos desta bebida.

O chá verde é constituído, em média, por 45% de polifenóis. Aproximadamente 26% dos compostos são catequinas, dos quais 11% são formados por 3-galato epigallocatequina (EGCG), 10% de epigallocatequina (EGC), 2% de 3-galato epicatequina (ECG), 2,5% epicatequina (EC) e 15% de polifenóis não identificados. Dentre estas substâncias, a EGCG parece exercer a mais pronunciada ação antioxidante. O potencial antioxidante das catequinas em ordem decrescente é:

EGCG = ECG > EGC = EC (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

As catequinas possuem importante ação antioxidante, quimioprotetora, anticancerígena, antiinflamatória, além da capacidade de se complexar com lipoproteínas e peptídeos. Como o chá verde é constituído por folhas *in natura*, ele contém maior concentração de antioxidantes, se comparado aos chás fermentados como o *oolong* e o chá preto (VINSON; TEUFEL; WU, 2004).

Nos últimos dez anos, vários pesquisadores têm demonstrado crescente interesse nas catequinas do chá verde. Isso se deve principalmente à sua grande abundância na natureza, as suas propriedades antioxidantes e seu provável papel na prevenção de várias doenças associadas ao estresse oxidativo. No entanto, os efeitos

¹ Docente da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde no Centro Universitário da Grande Dourados, Dourados – MS, Brasil

² Docente do Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicologia (PAC), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil

³ Docente do Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil

⁴ Docente do Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil

benéficos destas substâncias dependem da quantidade consumida no chá e de sua biodisponibilidade no organismo (MANACH et al., 2004).

Cai et al. (2002), testaram a ação do chá verde frente ao composto 2,2-azobis amidinopropano dihidroclorido (AAPH). O AAPH é um azo composto hidrossolúvel, o qual, em processo temperatura-dependente, gera radicais 2-amidinopropil (C-radical) que, na presença de O_2 , irá reagir e formar radicais peroxil (CELEDÓN et al., 2001). Estes radicais agem causando lipoperoxidação nos microsomos de fígado de ratos, pois possuem alto grau de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) na sua constituição. Neste experimento o chá mostrou ser eficaz na inibição da lipoperoxidação causada pelo AAPH, atuando como um potente removedor de radicais livres. Yokozawa et al. (2000) realizaram ensaios para testar a atividade antioxidante do chá frente ao AAPH em culturas de células epiteliais renais (LLC-PK1), obtendo resultados promissores.

A membrana eritrocitária é ricamente composta de PUFA, o que a torna muito susceptível ao ataque de radicais livres e por isso é um bom modelo experimental para o estudo da lesão oxidativa. A ação dos radicais livres nos eritrócitos pode levar a uma série de alterações, como formação de lipoperoxídeos, redução da deformabilidade, mudanças na morfologia, ligação cruzada e fragmentação de proteínas, hemólise e alterações no metabolismo intracelular (BEGUM; TERAQ, 2002; SATO et al., 1995; SADHU; WARE; GRISHAN, 1992).

Sato et al. (1995) e posteriormente Simão et al. (2005) realizaram estudos para avaliar a ação dos radicais livres gerados pelo AAPH sobre a membrana de hemácias humanas. Os radicais gerados pelo AAPH levam à lipoperoxidação da membrana da hemácia, sendo capaz de causar hemólise oxidativa em eritrócitos. Simão et al. (2005) demonstraram a atividade antioxidante e anti-hemolítica da genisteína, uma isoflavona da soja, usando este modelo de hemólise peroxidativa.

Não é de nosso conhecimento, até o presente momento, qualquer estudo que tenha investigado a atividade anti-hemolítica do chá verde em eritrócitos humanos. O objetivo deste estudo foi avaliar se o chá verde é capaz de inibir a hemólise oxidativa promovida pelo AAPH.

Material e Métodos

DETERMINAÇÃO DE HEMÓLISE

Eritrócitos humanos foram obtidos de doadores saudáveis, que não faziam uso de medicamentos e/ou suplementos vitamínicos que pudessem interferir no estresse oxidativo. Foi preparada uma suspensão de eritrócitos 1% em tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,4, utilizando eritrócitos recém-colhidos, e esta foi incubada com AAPH em diferentes concentrações (3 mM, 5 mM, 10 mM e 15 mM) a 37°C com agitação

constante entre 0 a 6 horas. O grau de hemólise (%) foi determinado pela medida da absorvência a 540nm (SIMÃO et al., 2005).

Preparo do Extrato das Folhas de *Camellia sinensis*

O extrato etanólico de chá verde (ECV) foi preparado a partir da infusão de folhas secas de *C. sinensis*, adquiridas da Quimer Ervas Medicinais. O extrato foi filtrado e concentrado em rota vapor, utilizando-se o ECV em diferentes concentrações para os vários testes realizados. O extrato etanólico de chá verde (ECV) foi dissolvido em solução tampão fosfato de K^+ monobásico 10mM contendo NaCl 0,9% em pH de 7,4 para obtenção de concentração final de 27mg/mL.

Avaliação da Atividade Anti-hemolítica do Chá verde

A solução do extrato etanólico de chá verde foi centrifugada por 5 minutos a 2.000 rpm e utilizou-se o sobrenadante para o teste. Foram preparadas quatro suspensões de eritrócitos a 1% e cada uma delas foi submetida a uma concentração diferente de chá verde. O primeiro sistema hemolítico continha suspensão de eritrócitos a 1% submetida a AAPH 5 mM. O segundo sistema hemolítico foi constituído da mesma forma, só que foi acrescido de 600µL de ECV (conc. final 0,54 mg/mL). O terceiro sistema hemolítico foi constituído de suspensão de eritrócitos 1% a acrescida de 600µL de ECV (conc. final 0,54 mg/mL) e o quarto apenas de suspensão de eritrócitos 1%. Os sistemas ficaram em banho-maria a 37°C, com agitação constante de 100 rpm. Uma alíquota de 3mL foi retirada a cada hora, durante 6 horas, transferida para um banho de gelo por 10 minutos para parar a reação do AAPH e posteriormente centrifugadas por 5 minutos a 2000rpm. O sobrenadante foi retirado para leitura de hemólise em 540nm (espectrofotômetro Varian 634 S). O controle de 100% de hemólise foi preparado com 25 µl de papa de hemácias em 9,975 mL de água destilada e incubado por 10 min. no banho-maria a 37 °C (LENFANT et al., 2000; ZHANG et al., 1997).

Curva Dose Resposta da Atividade Anti-hemolítica do Chá verde

Foram utilizados seis sistemas para as análises. O primeiro continha suspensão de eritrócitos a 1% em AAPH 5 mM. Do segundo até o sexto sistema, foi feito o mesmo sistema mas acrescido de doses crescentes de ECV em cada um deles (0,09 mg/mL, 0,18 mg/mL, 0,36 mg/mL, 0,54 mg/mL, 0,72 mg/mL na solução). Os frascos foram incubados em banho-maria a 37°C, com agitação constante de 100 rpm por 6 horas. Após este período, uma alíquota de 3 mL de cada frasco foi retirada e a hemólise foi lida a 540 nm.

Análise Estatística

As análises estão apresentadas como média e o erro padrão da média (SE). Empregando-se programa de análise estatística computadorizada STATISTICA 6.0 (STAT SOFT), a comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA), Teste T-Student e Teste de Tukey. Todas as conclusões estatísticas foram efetuadas em nível de 5% de significância.

Resultados

A hemólise ocasionada pelo AAPH demonstrou ser diretamente dependente do tempo e da concentração deste composto (figura 1). Para a realização dos experimentos com chá verde foi utilizado o sistema hemolítico contendo 5mM de AAPH, porque se conseguiu obter nesta concentração ainda uma boa quantidade de hemácias íntegras.

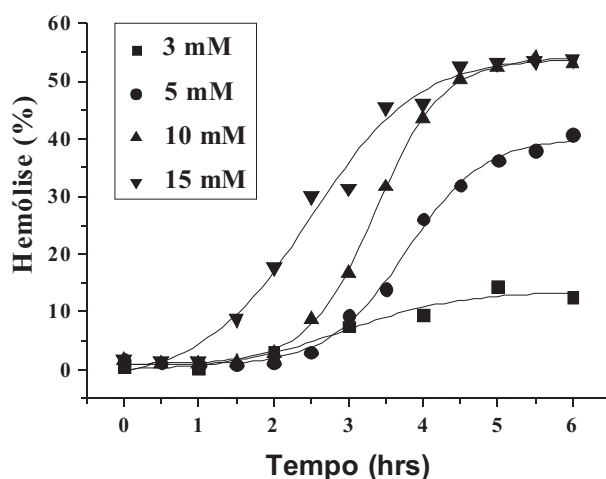


Figura 1: Curva de hemólise de hemácias submetidas a estresse oxidativo por AAPH. A suspensão de hemácias a 1% foi incubada com AAPH em diferentes concentrações por até 6 horas em banho-maria 37°C, ao abrigo da luz e com agitação constante.

A figura 2 demonstra a atividade anti-hemolítica do chá verde em diferentes concentrações. A concentração de 0,18 mg/mL de ECV foi capaz de inibir 70,3% da hemólise, a de 0,36 mg/mL inibiu 74,3%, a de 0,54 mg/mL inibiu 81,6% e finalmente 0,72 mg/mL inibiu 89,3% da hemólise causada pelo AAPH. Dentre as concentrações citadas, a concentração de 0,54 mg/mL, capaz de inibir 81,6% da hemólise, foi escolhida para a realização da curva de tempo.

O extrato etanólico do ECV inibe a hemólise induzida pelo AAPH de maneira tempo-dependente. A presença de AAPH 5 mM por 6 horas foi capaz de causar aproximadamente 60% de hemólise dos eritrócitos. A suspensão de hemácias na ausência de AAPH ou apenas na presença de ECV apresentou hemólise de 16,7% e 6,3% respectivamente, após 6 horas de incu-

bação (figura 3).

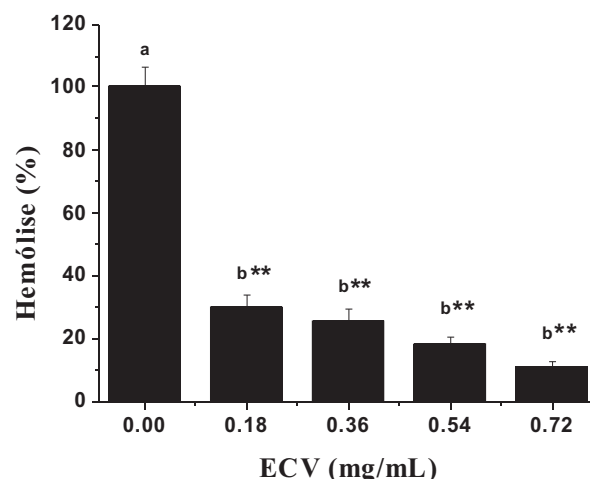


Figura 2: Atividade anti-hemolítica do ECV em diferentes concentrações em eritrócitos submetidos à AAPH. A suspensão de eritrócitos a 1% foi submetida à AAPH 5 mM por 6 horas e com diferentes concentrações de ECV. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. ** $p < 0,01$ comparado ao controle (0.00 de ECV).

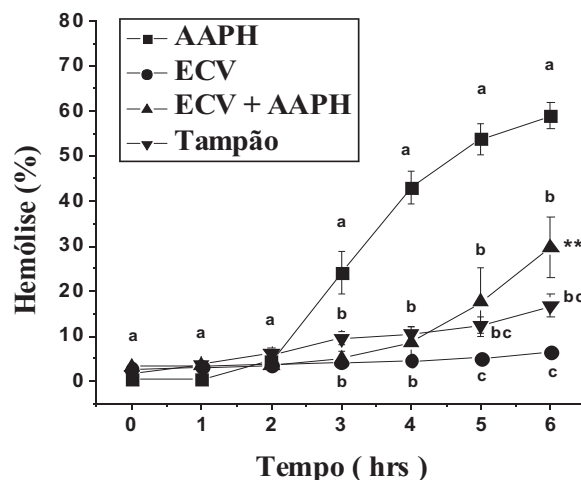


Figura 3: Atividade anti-hemolítica tempo-dependente do ECV em eritrócitos submetidos à AAPH. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão.

** $p < 0,01$ (comparação entre AAPH e AAPH + ECV).

Discussão

O uso do chá verde remonta a séculos e é uma das bebidas mais consumidas e de fácil aceitação no mundo todo. Mas foi somente há poucos anos que o chá se tornou um objeto de estudo da comunidade científica mundial, sendo seu consumo associado a vários benefícios à saúde.

O ECV demonstrou ser um potente inibidor da hemólise oxidativa causada pelo AAPH. A ação anti-

hemolítica das várias concentrações foram muito próximas. Este fato corrobora com o uso diário do chá como um agente antioxidante, mesmo em pequenas doses.

As catequinas exercem sua ação antioxidante, removendo radicais livres e quelando metais. Nos últimos dez anos, vários pesquisadores têm demonstrado interesse crescente nas catequinas do chá verde. Isso se deve principalmente à sua grande abundância na natureza, às suas propriedades antioxidantes e seu provável papel na prevenção de várias doenças associadas ao estresse oxidativo. Os efeitos benéficos destas substâncias dependem da quantidade consumida no chá e de sua biodisponibilidade no organismo (MANACH et al., 2004).

Para comprovar a ação antioxidante das catequinas, Cai et al. (2002) testaram a ação do chá verde frente ao composto 2,2-azobis amidinopropano dihidroclorido (AAPH), que gera radicais livres do tipo peroxil. Estes radicais agem causando lipoperoxidação nos microsomos de fígado de ratos, pois os microsomos possuem alto grau de ácidos graxos poliinsaturados na sua constituição. Neste experimento o chá mostrou ser eficaz na inibição da lipoperoxidação causada pelo AAPH, atuando como um potente removedor de radicais livres.

O AAPH é um azo composto capaz de gerar radicais livres a 37°C. Os radicais gerados pelo AAPH levam à lipoperoxidação da membrana da hemácia e, com isso, lesão celular, com liberação de hemoglobina e destruição da célula, demonstrando que o AAPH gera radicais capazes de causar hemólise (SATO et al., 1995; SIMÃO et al., 2005).

Yokozawa et al. (2000) realizaram ensaios para testar a atividade antioxidante do chá frente ao AAPH em culturas de células epiteliais renais (LLC-PK1), obtendo resultados promissores. Skrzydlewska et al. (2002) também realizaram um estudo *in vitro* para confirmar a ação antioxidante das catequinas, utilizando um gerador de radicais livres para causar lesão e quebra do DNA. As catequinas foram capazes de proteger o DNA da ação dos radicais livres e a EGCG foi o composto mais efetivo. Yanagimoto et al. (2003) demonstraram que a atividade inibitória do chá era dose dependente.

Saffari e Sadrzadeh (2004) investigaram a capacidade antioxidante do EGCG, frente ao AAPH, usando membranas de eritrócitos humanos como substrato para a reação. A extensão de dano oxidativo nas membranas foi avaliada medindo a peroxidação de lipídio, pelo método do ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e atividade da bomba de Na/K ATPases dependentes. A EGCG inibiu a peroxidação de lipídio nas membranas dos eritrócitos e protegeu a bomba de Na/K ATPases dependentes contra o dano induzido pelo AAPH.

Nossos dados demonstram a ação antioxidante e anti-hemolítica do chá verde em hemácias humanas. O ECV demonstrou claramente inibir a hemólise oxidativa causada pelo AAPH, sendo capaz de inibir em 70% a hemólise, mesmo na menor concentração

(0,09 mg/mL) utilizada. Isso colabora para o uso popular do chá, mesmo em pequenas doses, como um antioxidante. Também se pôde observar que a ação das várias concentrações é muito semelhante entre si. Esta semelhança pode ser consequência da capacidade das catequinas de formarem polímeros em soluções. Isso ocorre devido à liberação de íons hidrogênio (H^+) das catequinas para estabilizar os radicais livres, possibilitando a ligação desta catequina com outra catequina, formando um polímero. Outra explicação possível é a formação de pontes de hidrogênio entre as catequinas, diminuindo sua disponibilidade e ação antioxidante (CAI et al., 2002).

Nossos resultados confirmam os achados de Zhang et al. (1997), que, utilizando hemácias de ratos, também observou a inibição da hemólise pelo chá verde frente à ação do AAPH. As hemácias de animais tratados com chá verde foram mais resistentes à ação do AAPH que as hemácias dos ratos não tratados. O ECV pode proteger as hemácias da ação do AAPH, através dos possíveis mecanismos: estabilizando os radicais formados pelo AAPH doando H^+ ; interação das catequinas com a membrana lipoprotéica; estabilizando esta membrana, diminuindo seus poros e a liberação da hemoglobina; agindo como quelantes de ferro liberado pela hemólise, inibindo uma propagação da ação dos radicais livres pela reação de Fenton (KUMAZAWA et al., 2004). A quimioterapia do câncer é uma situação bastante comum nos dias de hoje e que pode causar anemia hemolítica, induzida pelo estresse oxidativo.

A suspensão de ECV, isoladamente, não provocou nenhuma hemólise, durante a incubação, se comparada com o resultado de hemólise provocada pela ação do tampão no quarto grupo. Segundo Elbling et al. (2005), há evidência de que os componentes do chá verde em solução podem gerar espontaneamente peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que podem lesar as membranas celulares. Entretanto, nossos dados demonstram que o sistema com ECV não gerou lesão aos eritrócitos. No presente estudo, diferentemente do proposto por Elbling, não foi observada hemólise pronunciada (6,2%) na presença do ECV pela ação de H_2O_2 gerado de maneira espontânea pelas catequinas do chá verde. Ao contrário, estas catequinas estabilizaram as membranas das hemácias em contato com o tampão, uma vez que no sistema apenas com a suspensão de eritrócitos a 1% a hemólise foi ainda maior (16,8%) do que com a presença do ECV.

Conclusão

Este estudo é o primeiro a avaliar os efeitos do chá verde em eritrócitos humanos submetidos a estresse oxidativo. Nossos resultados demonstram que o ECV é um importante e potente inibidor da hemólise oxidativa *in vitro*. Apesar de os dados obtidos colaborarem para a utilização do chá como um agente protetor importante, novos estudos clínicos e experimentais são necessários

para elucidar os mecanismos envolvidos nestes processos. O consumo de chá verde pode ser um promissor adjuvante no tratamento de doenças hemolíticas, doenças crônicas e na quimioterapia de câncer, em que pode ocorrer hemólise oxidativa.

Referências

- BEGUM, A. N.; TERAOKA, J. Protective effects of alpha-tocotrienol against free radical induced impairment of erythrocyte deformability. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 66, n. 2, p. 398-403, 2002.
- CAI, Y. J. et al. Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver microsomes. **Chem. Phys. Lipids.** v. 120, p. 109-117, 2002.
- CELLEDÓN, G. et al. Free radical-induced protein degradation of erythrocyte membrane is influenced by localization of radical generation. **IUBMB Life**, v. 51, p. 377-80, 2001.
- ELBLING, L. et al. Green tea extract and (–)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. **FASEB**, v. 19, n. 7, p. 807-809, 2005.
- KUMAZAWA, S et al. Direct evidence of interaction of green tea polyphenols, epigallocatechin gallate, with lipid bilayers by solid-state nuclear magnetic resonance. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 68, p. 1743-1747, 2004.
- LENFANT, F. et al. Lidocaine inhibits potassium efflux and hemolysis in erythrocytes during oxidative stress *in vitro*. **General Pharmacology**, v. 34, p. 193-199, 2000.
- MANACH, C; et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 79, p. 727-747, 2004.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.** v. 20, p. 933-56, 1996.
- SADHU, I. S.; WARE, K.; GRISHAN, M. B. Peroxyl radical-mediated hemolysis: role of lipid, protein and sulphhydryl oxidation. **Free Rad. Res. Comm.** v. 16, p. 111-122, 1992.
- SAFFARI, Y.; SADRZADEH, S. M. Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro. **Life Sci.** v. 74, p. 1513-1518, Feb. 2004.
- SATO, Y. et al. Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis by water-solution radical initiator. **Biochemistry**, v. 34, p. 8940-8949, 1995.
- SIMÃO, A. N. C. et al. Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2,2'-Azobis (Amidinopropane). **Life Sci.** v. 78, p. 1202-1210, 2006.
- SKRZYDLEWSKA, E. et al. Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. **Phytomedicine**, v. 9, p. 232-38, 2002.
- VINSON, J. A.; TEUFEL, K.; WU, N. Green and black teas inhibit atherosclerosis by lipid, antioxidant, and fibrinolytic mechanisms. **J. Agric. Food. Chem.** v. 52, p. 3661-3665, 2004.
- YANAGIMOTO, K. et al. Antioxidative activities of volatile extracts from green tea, oolong tea, and black tea. **J. Agric. Food. Chem.** v. 51, p. 7396-7401, 2003.
- YOKOZAWA, T. et al. Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride. **J. Agric. Food. Chem.** v. 48, p. 5068-5073, 2000.
- ZHANG, et al. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. **Life Sci.** v. 61, n. 4, p. 383-394, 1997.

Recebido em: 10/06/2008

Aceito em: 06/03/2009

Received on: 10/06/2008

Accepted on: 06/03/2009